

Klinik für Allgemeine Pädiatrie

# HABILITATIONSSCHRIFT

Strategien zur Immuntherapie beim Neuroblastom

zur Erlangung der Lehrbefähigung für das Fach Pädiatrie  
Medizinische Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

Dr. med Holger N. Lode

Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Zinkernagel  
2. Prof. Dr. G. Riethmüller

eingereicht: 31.01.2003  
Datum der Habilitation: 03.12.2003

## Zusammenfassung

Die vorgelegte Schrift zeigt den gegenwärtigen Stand möglicher Immuntherapiestrategien beim Neuroblastom. Damit bildet sie die wissenschaftliche Grundlage für weiterführende Entwicklungen von Therapieoptionen, die über den gegenwärtigen Einsatz des anti-GD<sub>2</sub> Antikörpers ch14.18 in klinischen Studien hinausgehen. Drei neue Behandlungsstrategien wurden untersucht: Immunzytokine, Zytokingentherapie und DNA-Vakzine.

Immunzytokine sind Fusionsproteine aus einem tumorspezifischen Antikörper und einem Zytokin und ermöglichen somit die Anreicherung des Zytokins im Tumormikromilieu. Damit liefern diese neuen Moleküle die Voraussetzung für sowohl aktive als auch passive Immuntherapie. In drei voneinander unabhängigen immunkompetenten Tiermodellen wurden Wirksamkeit und Mechanismus von zwei IL-2 Immunzytokinen (ch14.18-IL-2 und KS1/4-IL-2) untersucht. Es zeigte sich in allen experimentellen Modellen eine große Überlegenheit des IL-2 Immunzytokins im Vergleich zu Antikörper in Kombination mit freiem Zytokin. Damit wurde eine wesentliche Verbesserung gegenüber ausschließlich passiver Immuntherapie mit tumorspezifischen Antikörpern erreicht.

An der anti-Tumor Antwort nach IL-2 Immunzytokintherapie waren sowohl angeborene oder "innate" als auch erworbene oder "adaptive" Immunmechanismen beteiligt. Beim Neuroblastommodell stand die Aktivierung einer NK-Zell vermittelten Immunantwort im Vordergrund. Beim Melanom- und Kolonkarzinommodell hingegen zeigten sich T-Zell vermittelte Effekte mit Ausbildung einer Gedächtnisimmunantwort. Im Melanom- und Kolonkarzinommodell ergab sich also eine Impfwirkung, was somit die Verwendung vom IL-2 Immunzytokinen im Sinne einer Tumervakzine belegt. Beim schwach immunogenen Neuroblastom konnte diese Impfwirkung hingegen nicht erzielt werden. Als mögliche Ursache hierfür wurde das IL-2 in Betracht gezogen, welches auch in klinischen Studien bei Stadium 4 Neuroblastom Patienten vornehmlich eine Aktivierung von NK-Zellen auslöste und kein immunologisches Gedächtnis induzierte. Deshalb wurde die weiterführende Frage untersucht, ob ein stärkeres T<sub>H</sub>1 Zytokin wie IL-12 beim Neuroblastom einen Vorteil zeigen würde. Zu diesem Zweck kam die Zytokingentherapie zum Einsatz.

Zytokingentherapie mit IL-12 ist durch die heterodimere Natur dieses Zytokins erschwert. Für die Expression von IL-12 müssen beide Proteinuntereinheiten in gleicher Menge produziert werden. Dieses Problem wurde durch eine Fusion der beiden IL-12 Untereinheiten zu einem einzelkettigen oder "single chain" (sc) IL-12 gelöst.

Wirksamkeit und Mechanismus der Zytokingentherapie mit scIL-12 wurde im Neuroblastommodell untersucht. Es zeigte sich jetzt die Ausbildung einer T-Zell Immunantwort. Also muß es mindestens ein T-Zell Antigen geben, das diese Impfwirkung vermittelt. Experimente mit IL-2 im direkten Vergleich zu scIL-12 ergaben in Analogie zu ch14.18-IL-2 Immunzytokin eine NK-Zell Aktivierung, was die Überlegenheit von IL-12 beim Neuroblastom eindrücklich belegt. Die Ausbildung der T-Zell Aktivierung nach scIL-12 Gentherapie erfolgte über die Zytokinkaskade scIL-12, IFN- $\gamma$  und IP-10. Die Rolle von IP-10 in diesem Zusammenhang war überraschend und stellt eine neue Funktion dieses Chemokins dar.

Der Einsatz von DNA-Impfstoffen ergab erste Hinweise für die Herkunft von T-Zell Antigenen im Neuroblastommodell. Die Verwendung von DNA der Tyrosinhydroxylase, dem Schrittmacherenzym des Katecholaminstoffwechsels, führte zu einer T-Zell abhängigen Immunantwort gegen das Neuroblastom. Damit ergab sich eine interessante Analogie zum

Melanom. Hier ist Tyrosinase, das Schrittmacherenzym des Melaninstoffwechsels, ein T-Zellantigen.

Ein wesentlicher Aspekt der Immuntherapie, der sich in den hier zusammenfassend dargestellten Arbeiten immer wieder zeigte besteht darin, daß durch rationale Kombinationen immuntherapeutischer Strategien immer wieder eine Amplifizierung der anti-Tumor Immunantwort zu erreichen ist. Immunzytokine lassen sich mit anderen Strategien der biologischen Tumorthherapie kombinieren was zu synergistischen Effekten führt. Dazu zählt zum Beispiel die Kombination mit einem Angiogeneseinhibitor. Durch Immunzytokintherapie wäre wahrscheinlich auch ein wesentlicher Fortschritt in der Wirksamkeit von Impfstrategien gegen maligne Tumore zu erwarten, wenn man die hier vorgestellten präklinischen Ergebnissen zugrunde legt. Es konnte in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorstudien gezeigt werden, daß kleine Mengen Immunzytokin die Impfwirkung deutlich verstärken. Das gilt für die Zytokingentherapie [14] ebenso wie für die DNA-Vakzine. Die in dieser Schrift zusammengefaßten Daten zeigen, daß im Mikromilieu des Tumors angereichertes Zytokin die Wirksamkeit eines suboptimalen Impfstoffs durch Boosterung tumorspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich verbessert.

Eine Aktivierung tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen ist in vielen klinischen Tumorstudien beschrieben worden. Allerdings hatte diese Aktivierung nur selten zur Regression etablierter Tumore bei Patienten geführt. Es besteht also eine Diskrepanz zwischen meßbarer Aktivierung einer tumorspezifischen T-Zell Immunantwort und dem klinischen Ansprechen. Mit den hier dargestellten Arbeiten scheint es möglich diese in klinischen Versuchen immer wieder beobachtete Aktivierung von tumorspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einen bis lang noch sehr selten beobachteten Rückgang von Tumoren und deren Metastasen überführen zu können. Damit legen diese Ergebnisse eine wissenschaftliche Grundlage für die Verbesserung der adjuvanten Therapie beim Neuroblastom und bei anderen malignen Erkrankungen.

## **Abstract**

Neuroblastoma is a neuroectodermal malignancy of early childhood derived from sympathetic nervous tissue. At initial diagnosis over 50% of patients present with disseminated stage 4 disease which has a dismal prognosis. Effective treatment of patients with stage 4 neuroblastoma remains a major challenge in pediatric oncology. Despite novel therapeutic approaches including chemotherapy and autologous stem cell transplantation the overall survival rate of only 20-25% did not improve over the last two decades. Therefore, a lot of effort has been made to develop novel alternative therapies. This thesis summarizes possible immunotherapeutic strategies for the treatment of neuroblastoma.

## **Schlagwörter:**

Neuroblastom, Immuntherapie, Tumorimmunologie, Pädiatrische Onkologie, Adjuvante Therapie, Immunisierung

## **Keywords:**

Neuroblastoma, Pediatric Oncology, Adjuvant Therapy, Immunisation

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>IMMUNTHERAPIE DES NEUROBLASTOMS MIT IMMUNZYTOKINEN.....</b>	<b>9</b>
2.1	Eigenschaften von Immunzytokinen.....	9
2.2	Wirkung des IL-2 Immunzytokins im Neuroblastom Tiermodell .....	10
2.3	Mechanismen der Immunantwort nach Therapie mit IL-2 Immunzytokin .....	11
<b>3</b>	<b>ZYTOKINGENTHERAPIE .....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>DNA-VAKZINE .....</b>	<b>21</b>

## **Widmung**

Meiner Frau und meinen Kindern.

## **Abkürzungsverzeichnis**

ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
APC	Antigen Präsentierende Zelle
CDC	Complement-Dependent-Cytotoxicity
CDR	Complementarity Determining Region
CPL	Compartment for Peptide Loading
CTL	Zytolytische T-Zellen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	Major Histokompatibilitäts Komplex
TAA	Tumorassoziertes Antigen
TAP	Transporter Associated with Antigen Processing

## **Vorwort**

Die vorliegende Habilitationsschrift beschreibt den gegenwärtigen Kenntnisstand immuntherapeutischer Ansätze zur adjuvanten Therapie beim Neuroblastom mit Immunzytokinen, Zytokingentherapie und DNA-Impfstoffen. Die eigenen Beiträge zu dieser Thematik sind in 18 Originalarbeiten dokumentiert. Aus Gründen der Verständlichkeit werden wichtige Erkenntnisse, die auch in den eigenen vier Übersichtsarbeiten ausgeführt sind, in der folgenden Abhandlung kurz zusammengefaßt. Diese gliedert sich in Immuntherapie des Neuroblastoms mit Immunzytokinen [1-12], Zytokingentherapie [13-16] und DNA-Impfstoffe [17-22]. Kopien dieser Arbeiten sind in der gleichen Reihenfolge als Anlage angefügt und werden in numerischer Reihenfolge zitiert. Für diese Abhandlung wichtige Publikationen anderer Autoren sind in alphabetischer Reihenfolge zitiert. Dieser Zusammenfassung sind acht Abbildungen mit Legenden beigelegt die wesentliche Strukturen und Mechanismen der Immuntherapie unter den genannten Leitthemen anschaulich machen sollen.

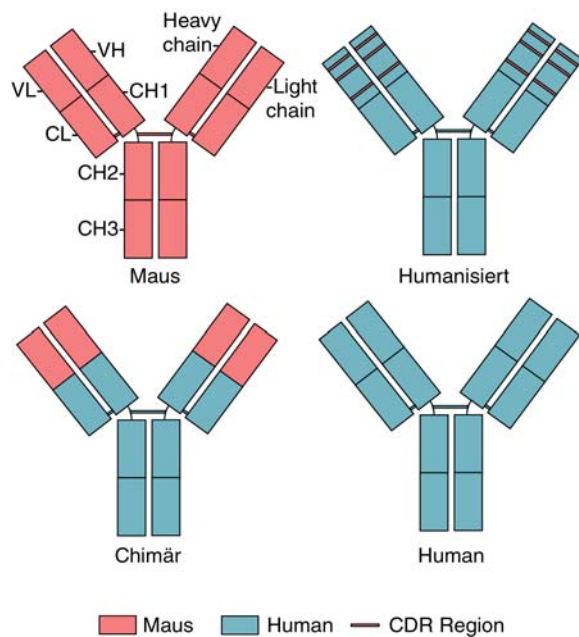
Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen war die präklinische Entwicklung neuer immuntherapeutischer Strategien zur adjuvanten Behandlung des Neuroblastoms. Dieses Projekt wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft in zweierlei Hinsicht gefördert. Die erste Förderung bestand aus einem Forschungsstipendium von 1996 -1998. Im Anschluß daran waren die Projekte vom National Institute of Health der USA gefördert. Die Fortsetzung der Projekte erfolgt seit 2001 im Rahmen der ersten von der DFG geförderten Emmy Noether Nachwuchsforschergruppe an der Charité.

## 1 Einleitung

Das Neuroblastom ist ein vom sympathischen Nervensystem ausgehender neuroektodermaler maligner Tumor des Kleinkindesalters. Bei über 50% der Neuroblastom-Ersterkrankungen liegt bereits das disseminierte Stadium 4 vor, das eine infauste Prognose hat. Eine wirksame Behandlung des Stadium 4 Neuroblastoms stellt deshalb nach wie vor eine der größten Herausforderungen der pädiatrischen Onkologie dar: Die Gesamtüberlebensrate von 20-25% der Kinder, die an dieser bösartigen Krankheit leiden, konnte während der letzten zwei Jahrzehnte trotz neuer Chemotherapie-Protokolle nicht wesentlich verbessert werden [Niethammer, 95; Matthay, 99]. Aus diesem Grund gibt es zunehmend Bestrebungen sich um Therapiealternativen zu bemühen.

Eine solche Alternative ist die adjuvant eingesetzte passive Immuntherapie mit monoklonalen anti-Gangliosid GD<sub>2</sub> Antikörpern. Grundlage für dieses Verfahren ist eine erhöhte Expression von Gangliosid GD<sub>2</sub> auf Neuroblastomzellen verglichen mit normalem Gewebe. Der erste monoklonale Antikörper, der beim Neuroblastom klinisch zum Einsatz kam, war der murine anti-Gangliosid GD<sub>2</sub> Antikörper 14G2a [Handgretinger, 92]. Dieser Antikörper wurde im Labor von Prof. R.A. Reisfeld in La Jolla, CA, USA über die klassische Hybridomtechnologie nach Hyperimmunisierung von Balb/c Mäusen mit humanen SK-N-AS Neuroblastomzellen erzeugt. Der klinische Einsatz des Mausantikörpers war vielversprechend. Bei den 9 behandelten Stadium 4 Neuroblastompatienten wurden 2 Komplettremissionen (CRs) und 2 partielle Remissionen (PRs) beobachtet. Nebenwirkung dieser Behandlung war eine periphere Polyneuropathie mit Schmerzen, wahrscheinlich als Folge der Bindung des Antikörpers an periphere Nervenenden. Ferner traten als Reaktion auf das murine Fremdprotein Juckreiz, Exanthem und Urtikaria auf. Aus diesem Grunde wurde der murine 14G2a Antikörper im Labor von Dr. Stephen D. Gillies mit den konstanten Regionen der schweren und leichten Kette eines humanen IgG1 Immunglobulins chimärisiert und später auch humanisiert. Das Prinzip von Chimärisierung und Humanisierung monoklonaler Antikörper ist zum besseren Verständnis in Abbildung 1 dargestellt.

Der neu erzeugte Mensch/ Maus chimäre anti-GD<sub>2</sub> Antikörper ch14.18 wurde nach seiner Produktion klinisch eingesetzt und führte zu einem Ansprechen bei 50% ausbehandelter Stadium 4 Patienten in klinischen Phase I und Phase I/II Versuchen. Ferner konnten einige Langzeit- und Komplettremissionen von Stadium 4 Patienten beobachtet werden [Handgretinger, 95]. Basierend auf diesen Daten wird der ch14.18 Antikörper derzeit in zwei großen Studien untersucht: die deutsche multizentrische Neuroblastomstudie NB 97 (nicht randomisiert) sowie die internationale HR-NBL-1 /ESIOP (randomisiert).



**Abbildung 1 Monoklonale Antikörper**

Nach der Entdeckung der Antikörper durch Emil von Behring im Jahre 1890, schlug Paul Ehrlich 1906 vor, diese als "magische Kugeln" und "vergiftete Pfeile" zu benutzen, um toxische Substanzen spezifisch auf pathogene Ziele zu richten [Silverstein, 88]. Dennoch verstrich der größte Teil eines Jahrhunderts, bevor eine auf Antikörper basierte Therapie eingeführt wurde. Diese Entwicklung wurde durch die Entdeckung der gegen gut charakterisierte Antigene gerichteten monoklonalen Antikörper (mAb) durch Köhler und Milstein 1975 beschleunigt [Kohler, 75]. Kurz danach wurde die Einführung der rekombinanten DNA-Technologien und ihre schnellen Fortschritte ein wichtiges Instrument in der Beschleunigung der Entwicklung eines Arsenal von genetisch hergestellten Antikörpern. Dies führte auch zu einer Verbesserung der Limitierungen durch monoklonale Antikörper, die von der Maus abstammen. Diese Limitierungen sind die Immunogenität des Mausproteins im Menschen, eine verkürzte Serumhalbwertszeit sowie ineffiziente Effektorfunktionen. Die angewendeten Schlüsseltechnologien, um Mausantikörper der menschlichen Immunglobulinsequenz anzugleichen, sind in ihrer historischen Reihenfolge Chimärisierung, Humanisierung und schließlich die Herstellung komplett humaner Antikörper in Mäusen, die transgen für das menschliche Immunglobulin Repertoire sind. Eine andere Möglichkeit ist der Weg über die Phage Display Technologie. Monoklonale Mausantikörper werden nach Immunisierung von Mäusen oder Ratten durch Fusion deren B-Zellen mit nicht sezernierenden Myelomzellen hergestellt, die man dann als Hybridome bezeichnet [Kohler, 75] (Mausanteil 100%). Chimäre Antikörper entstehen durch genetische Fusion der kodierenden Sequenzen der variablen Regionen eines monoklonalen Mausantikörpers mit den konstanten Regionen der schweren und leichten Kette eines humanen Immunglobulins (Boulianne et al. 1984) (Mausanteil: 30%). Humanisierung erfolgt durch das Einsetzen der CDR Region (complementarity determining region) des monoklonalen Mausantikörpers, also dem Bereich der direkt die Antigenbindung vermittelt, in ein humanes Immunglobulin (Mausanteil <5%). Komplett humane Antikörper werden durch Phage-Display Libraries hergestellt. Hier wird das gesamte menschliche Immunglobulinrepertoire auf der Oberfläche von Bakteriophagen präsentiert. Über einen Selektionsprozeß, den man als "Biopanning" bezeichnet, kann ein antigenspezifischer Phage isoliert werden, aus dem die humanen spezifischen variablen Regionen isoliert werden, die anschließend zur Herstellung eines gesamt IgGs dienen. Das zweite Prinzip zur Herstellung humaner Antikörper ist die Immunisierung von Mäusen, deren endogene Antikörperproduktion genetisch zerstört wurde, welche aber Transgene tragen, die für einen großen Anteil des humanen Immunglobulinrepertoires kodieren. Mit der klassischen Hybridomtechnik werden also aus diesen Mäusen humane monoklonale Antikörper hergestellt.

Die Wirkung des ch14.18 Antikörpers ist über "antibody-dependent-cellular-cytotoxicity" (ADCC) oder "complement-dependent-cytotoxicity" (CDC) erklärt. Beide Mechanismen führen zur Lyse von Tumorzellen. ADCC ist über den Fc-Teil in der konstanten Region der schweren Kette des Antikörpers vermittelt, der nach Antikörperbindung von Fc-Rezeptor

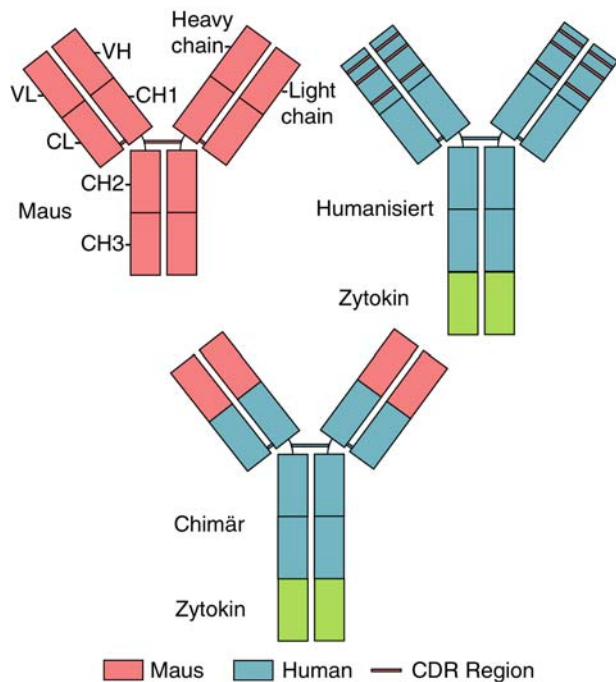
tragenden Effektorzellen wie NK-Zellen und Makrophagen erkannt wird. CDC wird über die Komplementbindungsstelle des Immunglobulins ausgelöst, die ebenfalls in der konstanten Region der schweren Kette des Immunglobulins liegt. Sie führt über eine Kaskade von löslichen Serumproteinen (analog zur Blutgerinnung) zur Bildung eines zytolytischen Membrankomplexes. Da wirksame ADCC besonders über IL-2 Rezeptor positive NK-Zellen vermittelt ist und weil eine Vielzahl von in vitro Studien eine Steigerung der Antikörper vermittelten ADCC Reaktion durch IL-2 zeigten, wurde das Prinzip einer Kombinationstherapie aus anti-GD<sub>2</sub> Antikörper und IL-2 klinisch bei Neuroblastompatienten geprüft. Daten dieses klinischen Versuchs der Phase I/Ib, in dem eine Kombinationstherapie von murinem Anti-GD<sub>2</sub> mAb 14.G2a und rekombinantem humanem IL-2 (rhIL-2) evaluiert wurde, zeigten ebenfalls anti-Tumor Aktivität [Frost, 97]. Aufgrund der ADCC steigernden Wirkung von IL-2 entstand die Idee ein Molekül zu schaffen, das die spezifische Antigenbindungseigenschaft eines monoklonalen Antikörpers mit der immunstimulatorischen Wirkung von IL-2 in einem Molekül vereinigt.



## **2 Immuntherapie des Neuroblastoms mit Immunzytokinen**

### **2.1 Eigenschaften von Immunzytokinen**

Immunzytokine sind rekombinante Antikörper-Zytokin-Fusionsproteine zur Krebstherapie (Abbildung 2). Sie liefern im wesentlichen die Voraussetzungen für passive und aktive Tumorimmuntherapie durch die gerichtete Gabe eines Antikörper Fc-Teils sowie eines Zytokins in das Tumormikromilieu. Dies fördert die Aktivierung einer Vielzahl immunologischer Effektorzellen, einschließlich der T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten und zerstört dadurch Tumorzellen und ihre Metastasen. Dies steht im Gegensatz zur passiven Immuntherapie, bei der Antikörper gegen tumor-assoziierte Antigene gerichtet sind und ausschließlich die natürlichen Effektormechanismen der Antikörper zur Zerstörung der Tumorzellen ausgenutzt werden. Im wesentlichen liefern Immunzytokine die Voraussetzungen für passive und aktive Immuntherapie durch den Transport eines Fc-Teils des Antikörpers und eines Zytokins in das Mikromilieu des Tumors. Als Folge der aktiven Immunisierung nach Immunzytokintherapie wurde in einer Reihe von Tiermodellen eine T-Zell-Aktivierung beobachtet. Dies führte zum Teil auch zur Ausbildung einer Gedächtnis-Immunantwort, auf die später noch eingegangen wird. Immunzytokine sind nicht patientenspezifisch, und haben somit einen großen Vorteil gegenüber Gentherapie mit autolog gewonnenen Tumorzellen oder dendritischen Zellen. Auch die heterogene Expression des Antigens stellt kein Problem der Therapie mit Immunzytokinen dar, da nur eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen für Immunzytokine als Anknüpfungsstellen benötigt werden. Nach deren Anreicherung im Mikromilieu des Tumors können Immunzytokine eine Vielzahl von immunologischen Effektoren aktivieren und expandieren, einschließlich T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten und zerstören dadurch Tumorzellen und ihre Metastasen. Nach der Herstellung eines Immunzytokins müssen zwei wesentliche biologische Funktionen für seine Wirksamkeit erhalten bleiben. Dazu gehören die Zytokin-Aktivität, sowie die spezifische Antikörperbindungsaffinität. Die Bioaktivität des fusionierten Zytokins bestimmt man in Proliferationsexperimenten mit Zelllinien, die nur in Gegenwart von Zytokin wachsen können. Mit solchen Zelllinien wird die Wirkung des Immunzytokins mit rekombinantem Zytokin als Standard verglichen. Die Bestimmung der Bindungsaffinität des fusionierten Antikörpers erfolgt durch kompetitive Verdrängung mit dem original Antikörper und anschließender "Scatchard-Plot" Analyse. Die resultierende Dissoziationskonstante  $K_d$  des Immunzytokins kann somit direkt mit der des originalen Antikörpers verglichen werden. Für das ch14.18-IL-2 Immunzytokin wurde eine mit ch14.18 Antikörper identische  $GD_2$ -Bindungsaffinität von 15 nMol/L bestimmt. Die spezifische IL-2 Aktivität lag bei 3000 IU/ $\mu$ g ch14.18-IL-2 Immunzytokin und entspricht somit dem Wert für rekombinantem Standard der Firma Chiron [1].



**Abbildung 2: Immunzytokine**

Immunzytokine werden durch Erzeugung von Kodierungssequenzen der Zytokine mittels Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription unter Verwendung von Primern konstruiert, welche ausgewählte Restriktionsstellen für Klonierungszwecke beinhalten. Diese Zytokingene werden mit den von chimären oder humanisierten Antikörpern fusioniert. Am Karboxylende der menschlichen schweren Kette der humanen konstanten Region C $\gamma$ 1 wird der Antikörper mit dem Zytokin verknüpft. So wurde das Gen von IL-2, TNF- $\beta$ , GM-CSF und IL-12 mit einem Mensch/ Maus chimären sowie humanisierten Anti-Gangliosid GD $_2$  Antikörper (ch14.18, hu14.18) fusioniert [Gillies, 91; Gillies, 93]. Die Plasmide werden in der Regel in nicht sezernierende Hybridomzelllinie Sp2/O-Ag14 durch Protoplastenfusion transfiziert. In der Gegenwart ansteigender Konzentrationen von Selektionsmedium wird das rekombinante Protein produziert. Die Reinigung von Fusionsproteinen erfolgt über den Fc-Teil des Antikörpermoleküls, welcher selektiv an Protein-A-Sepharose bindet.

## 2.2 Wirkung des IL-2 Immunzytokins im Neuroblastom Tiermodell

Erste Experimente mit IL-2 Immunzytokin wurden in Xenograft Modellen von humanen Neuroblastomtumoren in SCID Mäusen durchgeführt, die mit humanen lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen) rekonstituiert wurden. Die Ergebnisse zeigten bereits den überlegenen Effekt des ch14.18-IL-2 Immunzytokins verglichen mit IL-2 als Kontrolle oder einer Mischung von Antikörper plus IL-2 [Sabzevari, 94; Pancook, 96]. Allerdings kann eine Immunantwort nach Immunzytokinbehandlung nur in einem Tiermodell mit vollständig intaktem Immunsystem kritisch evaluiert werden. Wir entwickelten ein sygenes Neuroblastommodell, bei dem Gangliosid GD $_2$  im Tumorgewebe exprimiert wird [1].

Da murine C1300 Neuroblastomzellen kein GD $_2$  exprimieren und alle erhältlichen murinen Neuroblastomzelllinien von dieser Zelllinie abstammen und ebenfalls kein GD $_2$  exprimieren, wurde eine Hybridzelllinie zwischen C1300 Zellen und GD $_2$ -positiven Grenzstrang Ganglionzellen der Maus hergestellt. Das Sortieren nach Zellen mit hoher GD $_2$  Expression wurde eine neuen Zelllinie NXS2 mit heterogener aber stabiler Expression von Gangliosid GD $_2$  etabliert. Ferner zeigte diese Zelllinie auch eine Expression des Tyrosin-Hydroxylase-Gens vergleichbar mit der bei humanen Neuroblastomzelllinien. Darüber hinaus weist das NXS2 Modell viele Übereinstimmungen mit der Neuroblastomausbreitung beim Menschen auf. Insbesondere erfolgt nach subkutaner und intravenöser Injektion von NXS2 Zellen eine spontane und experimentelle Metastasierung an Orten, die so typisch für das menschliche

Neuroblastom sind, wie Befall des Knochenmarks, Ausbreitung in der Leber, in Lymphknoten und den Nebennieren. Bioverteilungsexperimente mit  $^{125}\text{I}$ -markiertem ch14.18-IL-2 zeigten eine spezifische Anreicherung des Immunzytokins sowohl in primären Tumoren als auch in Metastasen [1]. Die Behandlung mit ch14.18-IL-2 Immunzytokin eliminierte spontane wie auch experimentelle Knochenmark- und Lebermetastasen, die von NXS2 Neuroblastomen abgesetzt wurden. Äquivalente Mischungen von ch14.18 Antikörpern und rekombinantem IL-2 erwiesen sich hingegen als ineffektiv. Immunzytokinbehandelte Mäuse zeigten keine makroskopische Aussaat von Lebermetastasen und keine Metastasen in ihrem Knochenmark. Dies wurde durch Tyrosin-Hydroxylase RT-PCR bestimmt, die eine Tumorzelle in 100.000 Knochenmarkzellen nachweist. Eine Kaplan Meier Analyse von Mäusen mit Knochenmark- und Lebermetastasen, die mit Immunzytokin behandelt wurden, zeigte eine Verdoppelung der Lebensspanne [1]. Diese Daten bestätigten die gute Wirksamkeit der Therapie mit IL-2 Immunzytokin, das gegen das GD<sub>2</sub> Antigen gerichtet ist. Das GD<sub>2</sub>-Antigen kommt in diesem Tumormodell natürlich vor und wird heterogen exprimiert. Deshalb wird eine ähnlich gute Wirksamkeit auch beim Menschen erwartet, da tumor-assoziierte Antigene heterogen verteilt sind und der Metastasierungsprozeß gewöhnlich nicht auf ein einziges Organ begrenzt ist.

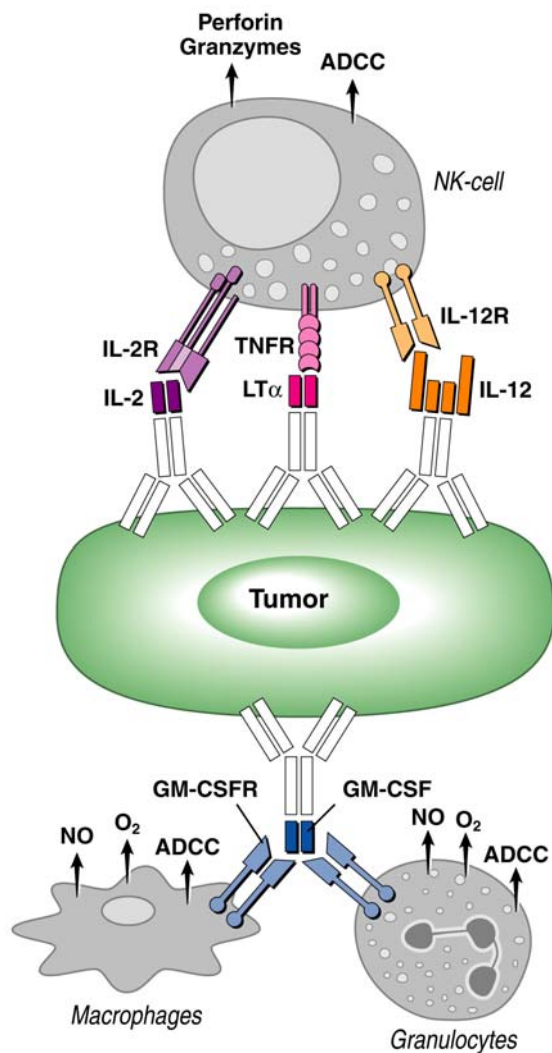
### **2.3 Mechanismen der Immunantwort nach Therapie mit IL-2 Immunzytokin**

Der Mechanismus der Immunantwort nach erfolgter Immunzytokintherapie ist in diesem syngenem Neuroblastommodell ausschließlich durch NK-Zellen vermittelt [2]. Folgende experimentellen Ergebnisse belegen diesen Mechanismus:

Erstens war die Behandlung von Leber- und Knochenmarkmetastasen mit ch14.18-IL-2 in T-Zell defekten scid/scid Mäusen vollständig wirksam und wurde erst in scid/beige Mäusen ineffektiv, die weder T- noch NK-Zellen haben. Nach der Rekonstitution von scid/beige Mäusen mit NK-Zellen war der therapeutische Effekt von ch14.18-IL-2 wieder sichtbar. Zweitens eliminierte die Depletion von NK-Zellen bei immunkompetenten, syngenem A/J Mäusen den Behandlungseffekt des Immunzytokins. Die Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen hatte keinen Einfluß auf die Wirksamkeit des Immunzytokins.

Drittens wurde ein Beitrag von CD8<sup>+</sup> T-Zellen ausgeschlossen, indem Mäuse nach erfolgreicher Behandlung von Leber- und Knochenmarkmetastasen mit ch14.18-IL-2, erneut mit NXS2 Zellen subkutan exponiert wurden. Elf Tage nach subkutaner Injektion war das subkutane Tumorwachstum in dieser Gruppe gleich groß wie in naiven Mäusen, unbehandelten tumor-tragenden Mäusen oder Mäusen, die eine Mischung aus Antikörper und IL-2 erhielten. Dieses Ergebnis zeigt das Fehlen einer Gedächtnis-Immunantwort an. Ein immunologisches Gedächtnis ist eine typische Eigenschaft der CD8<sup>+</sup> T-Zellen, nicht aber der NK-Zellen.

Viertens ziegte die immunhistochemische Analysen von entzündlichen Infiltraten in Lebern von Mäusen, die erfolgreich mit ch14.18-IL-2 behandelt wurden, eine positive Färbung für NK-Zellen, nicht aber für CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Im Gegensatz dazu fanden sich in Lebern von Mäusen, die PBS oder die Mischung aus Antikörper und rekombinantem IL-2 erhielten, keine inflammatorischen Zellen [2].



**Abbildung 3: "Innate" Immunantwort nach Therapie mit Immunzytokinen**

Originalarbeiten 1,2,7

Übersichtsarbeiten 9,10,11,12

Immunzytokine können die angeborenen oder "innate" Immunmechanismen gegen Tumorzellen richten. Lymphotoxin- $\alpha$  [Reisfeld, 96], IL-12 [Gillies, 98] und IL-2 [1,2,7] Immunzytokine bewiesen wirksame Aktivierung von NK-Zellen. Dies führt zu einer Steigerung der tumoriziden Wirkung von NK-Zellen, die sowohl über die ADCC Reaktion als auch über direkte Zell-Zell Interaktion vermittelt wird. Die Zerstörung der Zielzellen erfolgt dann durch eine Freisetzung von Perforin und Granzym aus sekretorischen Granula. Die experimentelle Beweisführung für den NK-Zell abhängigen Mechanismus des IL-2 Immunzytokins beim Neuroblastom ist in den Originalarbeiten [1,2,7] beschrieben. Ähnliche Verbesserungen der ADCC Reaktion und eine Steigerung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen sowie von NO Radikalen wurden für GM-CSF Immunzytokine gezeigt [Batova, 99] [7]. Diese aktivieren GM-CSF Rezeptor tragende Zellen wie Granulozyten und Makrophagen im Mikromilieu des Tumors und töten die Zielzellen über NO- und Sauerstoffradikale ab.

Die Daten der anti-Tumor Wirkung des IL-2 Immunzytokins im Neuroblastom Modell wiesen also auf einen angeborenen oder "innate" Immunmechanismus hin (Abbildung 3).

Das Prinzip der Therapie mit Immunzytokinen wurde auch in anderen Modellen untersucht, um seine Allgemeingültigkeit ableiten zu können. Von uns wurden das Melanom und das Kolonkarzinom als Modelle herangezogen.

Auch beim malignen Melanom, das dem Neuroblastom verwandt ist, konnte eine ausgezeichnete anti-tumor Wirkung des IL-2 Immunzytokins gezeigt werden [3]. Das humane Melanom ist ebenfalls ein neuroektodermaler Tumor, der durch eine erhöhte Expression

verschiedener Ganglioside charakterisiert ist, einschließlich des Disialogangliosids GD<sub>2</sub> (GD<sub>2</sub>). Wie beim murinen Neuroblastom ist das Gangliosid GD<sub>2</sub> in allen murinen Melanomzelllinien nicht exprimiert. Deshalb wurde die murine B16 Zelllinie mit humanen Genen transfiziert, die für Enzyme der letzten Schritte in der GD<sub>2</sub> Biosynthese kodieren. Das sind die Enzyme beta-1, 4-N-Acetylgalactosaminyltransferase und alpha-2,8-Sialyltransferase. Die so transfizierten B16 Zellen zeigten stabile GD<sub>2</sub> Expression, bildeten nach intrasplenischer oder intravenöser Injektion experimentelle Leber- oder Lungen-Metastasen in syngen C57BL/6 Mäusen. Bioverteilungsexperimente mit <sup>125</sup>I-markiertem ch14.18-IL-2 zeigten ebenfalls spezifische Anreicherung im Tumorgewebe [Becker, 96a].

Die Behandlung von etablierten Leber- und Lungenmetastasen in C57BL/6J Mäusen mit ch14.18-IL-2 Fusionsprotein eliminierte in der Mehrzahl der Mäuse die Metastasen vollständig. Tiere mit residueller makroskopischer Erkrankung zeigten einen dramatischen Rückgang des Tumorbefalls, verglichen mit Mäusen, die keine Behandlung erhielten oder die mit einer äquivalenten Mischung aus ch14.18 und rekombinantem IL-2 injiziert wurden. Der Behandlungseffekt war spezifisch, da ein unspezifisches Immunzytokin, das gegen den humanen EGF-Rezeptor gerichtet ist (ch225-IL-2), keine Anti-Tumorstimmung zeigte [Becker, 96a]. Die Wirksamkeit der Fusionsproteintherapie wurde durch eine zweifache Verlängerung der Lebensspanne zusätzlich dokumentiert, ein Effekt der nur in immunzytokin-behandelten Mäusen auftrat. Wie im Neuroblastommodell bewältigte die Immunzytokintherapie eine Heterogenität der GD<sub>2</sub>-Antigenexpression, die im Melanommodell künstlich erzeugt werden mußte. Dies konnte durch die erfolgreiche Zerstörung von Melanommetastasen gezeigt werden, die nur zu einem kleinen Prozentsatz aus Antigen-positiven Tumorzellen bestanden. Antigenheterogenität wurde erzeugt, indem eine Mischung aus GD<sub>2</sub> positiven Zellen und GD<sub>2</sub> negativen Zellen in einem Verhältnis von 1 zu 5 zur Induktion der Metastasen eingesetzt wurde. Die Behandlung mit ch14.18-IL-2 war bei diesem Verhältnis noch vollständig wirksam [Becker, 96b].

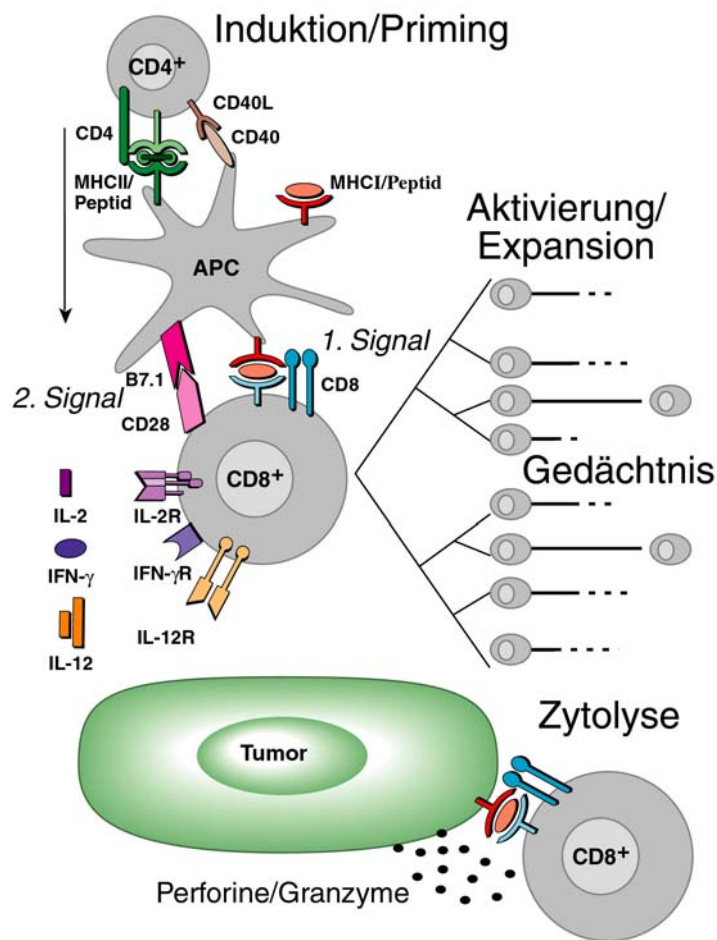
Die Immunzytokinbehandlung des Melanoms induzierte eine T-Zell-abhängige, also adaptive Immunreaktion [3]. Darauf weisen eine Vielzahl funktionaler und histochemischer Untersuchungen hin, deren Ergebnisse im Folgenden kurz dargestellt werden. Damit unterscheidet sich der Immunmechanismus im Melanommodell grundsätzlich von dem im Neuroblastommodell.

Immunhistochemische Untersuchungen zeigten bei immunzytokin-behandelten Tieren eine vorwiegend lymphozytäre entzündliche Reaktion, mit positivem Nachweis weniger Granulozyten und Makrophagen. Das wurde durch eine starke Färbung mit anti-CD8- und zu einem geringeren Ausmaß mit anti-CD4-Antikörpern bestätigt. Im Gegensatz zum Neuroblastommodell wurden hier nur vereinzelt NK-Zellen in der Tumorpherie gefunden. Tumorfildierende Lymphozyten bestanden fast ausschließlich aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen und wenigen CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Einen deutlichen Hinweis auf einen T-Zell vermittelten Mechanismus erbrachten Experimente in C57BL/6 scid/scid Mäusen, die keine reifen T- und B-Zellen haben, sowie in C57BL/6 beige/beige Mäusen, die keine funktionalen NK-Zellen haben. Die Behandlung von etablierten Lungenmetastasen mit ch14.18-IL-2 Immunzytokin war in der Abwesenheit von NK-Zellen erfolgreich, nicht aber in der Abwesenheit von T-Lymphozyten. Diese Ergebnisse wurden durch die Depletion von T-Zell-Subpopulationen in vivo unterstützt, welche zeigen, daß die Anwesenheit von CD8<sup>+</sup> T-Zellen für eine effektive Immunreaktion in diesem Modell obligatorisch ist. Die Beteiligung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen an der Immunantwort wurde auch in Zytotoxizitäts-Assays deutlich. Nur Splenozyten oder gereinigte CD8<sup>+</sup> T-Zellen von immunzytokin-behandelten Mäusen zerstörten Melanomzellen spezifisch und MHC Klasse I abhängig [Becker, 96a].

Ferner konnte nach erfolgreicher Therapie mit ch14.18-IL-2 Immunzytokin durch horizontalen Transfer von T-Zellen der Nachweis einer andauernden und übertragbaren Tumormunität erbracht werden. Außerdem konnte im Melanommodell im Gegensatz zum Neuroblastom ein immunologisches Gedächtnis nachgewiesen werden. Mäuse nach erfolgreicher Behandlung mit IL-2 Immunzytokin von etablierten subkutanen Melanomtumoren oder von etablierten pulmonalen Melanommetastasen haben eine spätere letale intravenöse Injektion mit Melanomzellen abgestoßen. Dieser Effekt konnte bis zu 4 Monate nach der initialen Behandlung in mindestens 50% aller Tiere beobachtet werden. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu den Mäusen, die anfänglich mit einer äquivalenten Mischung aus ch14.18 und rekombinantem IL-2 behandelt wurden oder jenen, die eine Kryotherapie ihrer subkutanen Tumore erhielten. Diese Kontrollereperiment zeigen, daß weder IL-2 alleine noch die Freigabe von Tumorantigenen für sich ausreichte, um eine anhaltende T-Zell vermittelte tumor-protektive Immunität auszulösen. In einem weiteren Kontrollereperiment wurden Mäuse nach erfolgreicher Melanombehandlung mit einer nichtverwandten syngenischen Tumorzelllinie (EL4) injiziert, welche die Anknüpfungsstelle GD<sub>2</sub> exprimieren. Die Injektion mit EL4 Zellen führte zu einer fulminanten Metastasierung in denselben Mäusen, die gegenüber Injektionen von murinen Melanomzellen völlig geschützt waren. Diese Daten weisen darauf hin, daß die bis jetzt noch unbekannten Tumorantigene, welche für die tumorprotektive Immunität verantwortlich sind, völlig unabhängig vom GD<sub>2</sub> Kopplungsantigen sind. Das GD<sub>2</sub> wird also lediglich dazu benutzt IL-2 in das Tumormikromilieu zu bringen.

T-Zell Antigene erklären möglicherweise den Unterschied zwischen Melanom- und Neuroblastommodell. T-Zell Antigene sind kurze Peptide mit einer Länge von 8-9 Aminosäuren, die im Kontext von MHC Klasse I auf der Tumorzelloberfläche präsentiert werden. Sie spielen eine wesentliche Rolle in der Aktivierung einer CD8-Immunantwort (Abbildung 4).



**Abbildung 4: Induktion einer T-Zell Immunantwort**

Die Entstehung einer zellulären anti-Tumor-Immunantwort setzt die Existenz eines tumor-assoziierten T-Zell Antigens voraus (MHC I/Peptid Komplex), das vom Immunsystem erkannt werden kann. Solche Antigene werden von Antigenpräsentierenden Zellen (APC) prozessiert und als kurze Peptide mit einer Länge von 8-9 Aminosäuren im Kontext von MHC Klasse I oder 12-20 Aminosäuren im Kontext von MHC Klasse II auf der Zelloberfläche präsentiert. Antigene, die über MHC Klasse I auf der Oberfläche von APCs präsentiert werden, haben vornehmlich einen endogenen, intrazellulären Ursprung, werden im endoplasmatischen Retikulum mit MHC-Klasse I zusammengesetzt und an die Zelloberfläche transportiert. Der Tumorantigen-MHC Klasse I-Komplex wird durch eine hochaffine Interaktion mit dem T-Zell Rezeptor von  $CD8^+$  T-Zellen erkannt. Als Korezeptor dient das CD8-Molekül, welches an die  $\alpha 3$  Domäne der  $\alpha$  Kette von MHC Klasse I bindet. Diese Interaktion vermittelt das 1. Signal der T-Zell Aktivierung. Das 2. notwendige Signal wird entweder durch Zytokine, insbesondere Interleukin (IL) -2, oder durch APC-T-Zell Interaktionen wie zum Beispiel B7-CD28 bereitgestellt. Die Entstehung der zytolytischen  $CD8^+$  T-Zellen (CTL) erfolgt nach klonaler Expansion dieser spezifischen T-Zellen und der Expression von Organellen, die nach spezifischer Erkennung des Tumorantigen-MHC Klasse I-Komplexes auf der Tumorzelle die Zytolyse durch Ausschüttung von Perforinen und Granzymen auslösen können. Dies sind Organellen, die direkt die Zellmembran zerstören.

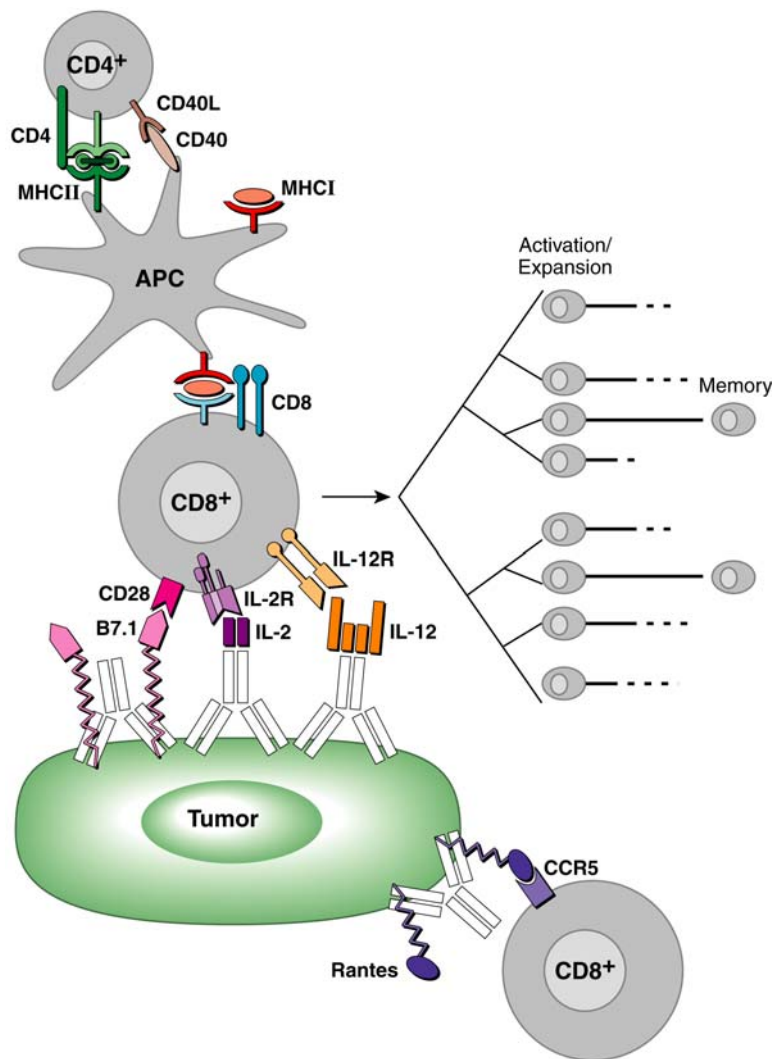
Es ist denkbar, daß es so ein T-Zell Antigen beim Neuroblastom nicht gibt. Oder es existiert ein T-Zell Antigen, welches aber nur schwach immunogen ist, so daß IL-2 nicht ausreicht eine T-Zell Aktivierung zu stimulieren. Diese Fragen werden in Experimenten zur Zytokingentherapie des Neuroblastoms weiter erörtert. Eine wichtige Rolle bei der wirksamen Induktion einer  $CD8$ -Immunantwort spielen  $CD4^+$  T-Zellen sowie

antigenpräsentierende(APC)-Zellen. Diesen Sachverhalt haben wir im Melanommodell eingehend untersucht [3]. Die Aktivierung von APCs durch Immunzytokin-Therapie wurde mittels FACS Analysen gezeigt. Hierfür wurden CD11c positive Zellen, die im wesentlichen dendritische APCs darstellen, auf B7-2 Expression hin untersucht. Dieser Aktivierungsmarker war nach Immunzytokin-Therapie signifikant hochreguliert. Ferner konnte in einer Reihe von Knockout-Mäusen mit Defekten im CD4-T-Zell Kompartiment gezeigt werden, daß die Immunzytokintherapie nur partiell wirkt [3]. Damit wurde die wichtige Helferfunktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterstrichen. Als Mechanismus der CD4-Hilfe wurde bis vor wenigen Jahren die parakrine Sekretion von IL-2 durch aktivierte CD4-Zellen angesehen. Diese Sichtweise hat sich heute grundlegend geändert, was auch in diesem Modell experimentell gezeigt werden konnte. In IL-2 Knockout-Mäusen war die Therapie mit Immunzytokin genauso wirksam wie im Wildtyp-Stamm, ein Befund der den parakrinen IL-2 Mechanismus ausschließt [3]. Wird allerdings die Interaktion zwischen CD40 auf APCs und CD40 Ligand auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch blockierende Antikörper unterbunden, wird auch die Wirksamkeit des Immunzytokins deutlich gehemmt. Dieses Ergebnis unterstreicht die Rolle der CD40-CD40 Ligand Interaktion als einen wesentlichen Mechanismus der CD4-Hilfe. Die Wirkung dieser Interaktion auf die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurde in FACS Analysen unter Beweis gestellt. Als Marker dienten hier CD69 und CD25, die eine CD8<sup>+</sup> T-Zellaktivierung anzeigen. Nach Immunzytokintherapie steigt die Zahl aktivierter CD8-T-Zellen deutlich an, und dieser Effekt läßt sich durch Depletion CD4<sup>+</sup> T-Zellen wieder aufheben. Diese Untersuchungen bestätigen, daß für Immunzytokintherapie notwendige CD4-Hilfe über CD40-CD40 Ligand Interaktion vermittelt wird und nichts mit parakriner Sekretion von IL-2 zu tun hat [3].

Zusammenfassend haben die Daten aus dem Melanommodell den Beweis für das Konzept erbracht, daß ein IL-2 Immunzytokin im Tumormikromilieu in der Lage ist Reaktionen auszulösen, die etablierte Metastasen zerstören können. Ferner kann das Immunzytokin eine durch T-Zellen vermittelte Gedächtnis-Immunantwort auslösen. Das legt nahe, daß dieses Verfahren als Tumoringpfung verwendbar ist. Der Mechanismus ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

Aufgrund der Dichotomie der Immunmechanismen des IL-2 Immunzytokins im Neuroblastom- und Melanom-Modell, wurden Untersuchungen in einem dritten unabhängigen Tumormodell angestrebt. Auch in einem immunkompetenten syngenem Kolonkarzinommodell konnte eine gute Wirksamkeit eines IL-2 Immunzytokins gezeigt werden [4,5,6]. Dieses Modell zeichnet sich durch die Expression des humanen Epithelialen Zelladhäsionsmoleküls EpCAM aus, das spezifisch durch das KS1/4-IL-2 Immunzytokin erkannt wird.





**Abbildung 5: Adaptive Immunantwort nach Therapie mit Immunzytotoxinen**

Originalarbeiten 3-6 Übersichtsarbeiten 9-12

Die gezielte Gabe von Immunmodulatoren an Tumorzellen führt zu einem besonderen Tumor-Mikromilieu, das die Migration von T-Zellen erleichtert (RANTES) und das zweite Signal für die effektive T-Zell Rezeptor Aktivierung einer T-Zell Immunantwort bereitstellt (B7.1, IL-2, IL-12) [3-6]. Diese Aktivierung wird wesentlich durch die CD40/ CD40L vermittelte Hilfe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen unterstützt [3], was zur Expansion zytotoxischer T-Zell Klone führt und die Induktion einer Gedächtnisimmunantwort nach sich zieht.

An dieser Stelle sei erwähnt, daß EpCAM mit GA733-2 identisch ist, welches vom murinen Antikörper 17-1A (Panorex®) erkannt wird. In einer randomisierten klinischen Studie an 189 Patienten mit minimaler Resterkrankung nach kompletter Resektion eines Dukes' C Kolonkarzinoms zeigte sich im 5 Jahres "follow-up" eine Reduktion der Rückfallrate um 27% in der mit 17-1A behandelten Gruppe [Riethmueller, 94]. Aufgrund dieser Daten wurde die Herstellung des KS1/4-IL-2 Immunzytotoxins vorangetrieben [4] [Gillies, 98].

Ähnlich dem Melanommodell war hier der Immunmechanismus über die Aktivierung einer CD8<sup>+</sup> T-Zell Immunantwort vermittelt [4]. Mäuse mit etablierten experimentellen Lebermetastasen konnten durch die Behandlung mit IL-2 Immunzytotoxin komplett geheilt werden. Im weiteren Verlauf wurde auch die Induktion einer CD8<sup>+</sup> T-Zell vermittelten

Gedächtnisimmunantwort nachgewiesen [5]. Mäuse, die nach Behandlung mit tumorspezifischem KS1/4-IL-2 Immunzytokin geheilt waren, haben eine erneute Tumorzellexposition bis zu 20 Wochen nach Primärbehandlung in 50% der Fälle komplett abgestoßen. In solchen Mäusen ließ sich auch eine Erhöhung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem Phänotyp von Gedächtniszellen nachweisen. In sekundären lymphatischen Organen zeigte sich ein Anstieg von CD44<sup>hi</sup>, Ly-6C<sup>hi</sup>, CD45RB<sup>lo</sup> und CD62L<sup>lo</sup> CD8<sup>+</sup> Gedächtnis T Zellen um 10%. Ferner zeigte sich ein 30 facher Anstieg der Frequenz an Vorläuferzellen von zytotoxischen T-Zellen ("pCTL frequency") [5].

Diese Gedächtnisimmunantwort ließ sich auch in der Abwesenheit von Antigen aufrecht erhalten [6]. Hierzu wurden CD8<sup>+</sup> T Zellen von IL-2-Immunzytokin behandelten Tieren horizontal auf syngene *scid/scid* Mäuse übertragen. Diese CD8<sup>+</sup> T Zellen wurden für 6 Wochen in den immundefekten SCID Mäusen, die keine reifen T und B Lymphozyten haben, geparkt. Der Sinn liegt darin aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen über Apoptose absterben zu lassen. Das konnte mittels FACS Analysen durch kontinuierliche Abnahme der transferierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen gezeigt werden. Die wahren CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen persistieren, in diesem Falle in der Abwesenheit von Antigen. Wenn diesen SCID Mäusen Tumorzellen und kleine Dosen KS1/4-IL-2 Immunzytokin gespritzt wurde zeigte sich das funktionale immunologische Gedächtnis, indem diese Tumorzellen abgestoßen wurden. Ferner ließ sich eine ausgeprägte Aktivierung tumorspezifischer CD8<sup>+</sup> T Zellen nachweisen, was über die gesteigerte Expression von CD25, dem hochaffinen IL-2 Rezeptor, sowie CD69, dem frühen T-Zell Aktivierungsmarker und der gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer T<sub>H</sub>1 Zytokine wie IL-2, IL-12 und GM-CSF eindrucklich gezeigt werden konnte [6]. Diese Daten bestätigen den T-Zell abhängigen Mechanismus nach IL-2 Immunzytokintherapie, der auch im Melanom-Modell festgestellt wurde, und sie unterstreichen den Unterschied zum Neuroblastom, bei dem ausschließlich eine Aktivierung von NK-Zellen gefunden wurde.

Der Beweis der Universalität des Therapieprinzips einer zielgerichteten Gabe von Zytokinen in das Tumormikromilieu wurde durch Immunzytokine erbracht, in denen der anti-Transferrinrezeptor-Antikörper mit IL-2 oder GM-CSF fusioniert worden war [7]. Der Transferrinrezeptor wird von stark proliferierenden Tumorzellen hoch exprimiert, findet sich aber in geringerem Maße auch auf normalem Gewebe. Der Transferrinrezeptor erfüllt somit die Eigenschaft eines tumor-assoziierten Antigens. Trotzdem konnte mit beiden anti-Transferrinrezeptor-Immunzytokinen eine anti-Tumor-Immunantwort im Neuroblastom- und im Kolonkarzinommodell gezeigt werden, die genauso wirksam war wie die Therapie mit ch14.18-IL-2 [1,2] oder KS1/4-IL-2 [4,5,6] Immunzytokin.

Eine weitere Strategie zur Behandlung des Neuroblastoms ergibt sich aus dem Synergismus der aus der Kombination von Immunzytokintherapie und dem Prinzip der Antiangiogenese entsteht. Dies konnte eindrucksvoll in präklinischen Modellen gezeigt werden [8]. Behandlungsgruppen, die sowohl die anti-angiogene Behandlung als auch die Immunzytokintherapie erhielten zeigten im Gegensatz zu Kontrollen kaum eine nachweisbare Metastasierung. Die anti-angiogene Komponente der Kombinationstherapie bestand hier aus einem Integrin-Antagonisten (EMD 121974) [Brooks, 94a; Brooks, 94b]. Die Kombinationsbehandlung führte zu einem 5 fachen Anstieg der Infiltration der Tumore durch inflammatorische Zellen gegenüber Kontrollgruppen. Immunhistochemische Analysen ergaben, daß es sich hierbei hauptsächlich um dendritische Zellen handelt. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf die Notwendigkeit hin, in der biologisch orientierten Tumorthherapie vermehrt über wirksame Kombinationsstrategien nachzudenken, um so dem Ziel adjuvante Therapieprinzipien in der klinischen Anwendung wirksamer zu machen, näher zu kommen.

### 3 Zytokingentherapie

Eine mögliche Ursache für das Ausbleiben einer T-Zell Immunantwort nach IL-2 Immunzytokin-Therapie beim Neuroblastom ist die Wahl des Zytokins. Dies wurde durch Zytokingentherapie mit IL-12 im direkten Vergleich zu IL-2 überprüft [13-16]. Das Prinzip der Zytokingentherapie beruht darauf, die Immunogenität eines Tumors durch Transfektion von Zytokingenen und deren parakrine Produktion durch die Tumorzellen so zu erhöhen, daß eine T-Zell Aktivierung erfolgen kann [Pardoll, 95] (Abbildung 6)[Pardoll, 98]. Das Prinzip ist also ähnlich der Therapie mit Immunzytokinen, bei der die Zytokinkonzentration im Tumor exogen mittels monoklonalem Antikörper erhöht wird. Deshalb sind Vergleiche mit Ergebnissen aus dem vorhergehenden Kapitel zulässig. Allerdings erfordert die Zytokingentherapie die Isolierung der Tumorzellen vom Patienten und deren ex vivo Transfektion, was aufgrund des patientenspezifischen Therapieansatzes eine Reihe technischer Probleme mit sich bringt. Diese Probleme stellen sich im tierexperimentellen Ansatz mit Zelllinien nicht, da eine im Prinzip unbegrenzte Zahl an Tumorzellen für die Transfektion erzeugt werden kann. Somit liefert diese Strategie ein gutes Werkzeug, um die Frage nach dem "richtigen" Zytokin für das Neuroblastom zu beantworten.

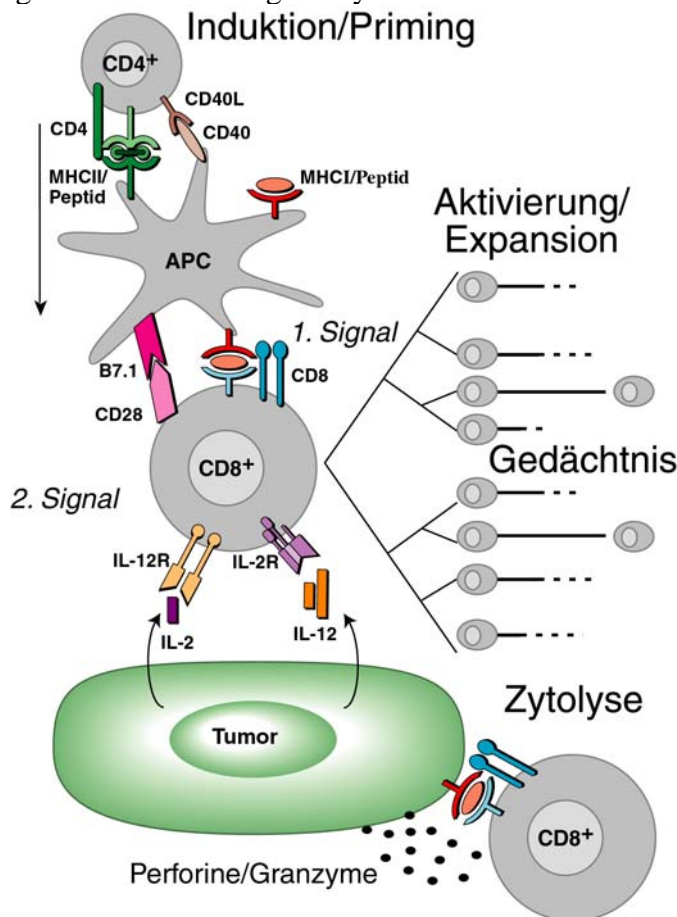


Abbildung 6: Prinzip der Zytokingentherapie

Originalarbeiten 13-18

Autologe Tumorzellen werden durch Transfektion von Zytokinen genetisch so verändert, daß sie Zytokine produzieren, die das 2. Signal zur T-Zell Rezeptoraktivierung liefern. Die Folgende Aktivierung und Expansion der T-Zellen führt zur Zytolyse des Tumors gefolgt von der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis. Der direkte Vergleich von IL-2 mit IL-12 beim Neuroblastom ergab, daß ausschließlich IL-12 in der Lage war eine T-Zell Immunantwort auszulösen [13-16]. Dieser Effekt war über die Zytokinkaskade IL-12, IFN- $\gamma$  und IP-10 vermittelt [16].

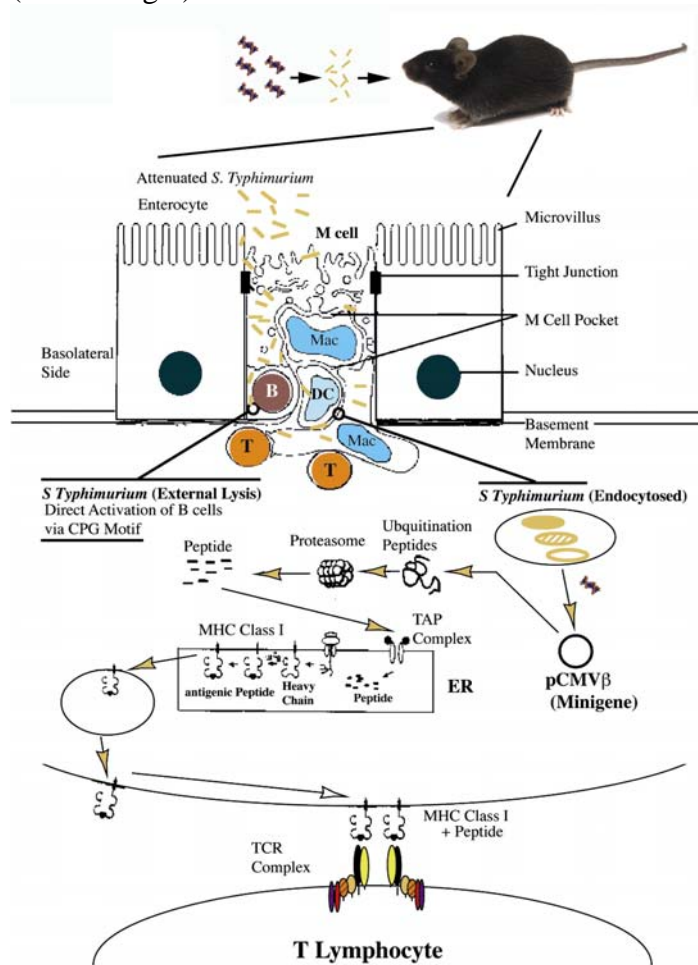
Ein klinischer Versuch mit IL-2 Gentherapie bei ausbehandelten Stadium 4 Neuroblastom Patienten zeigte vielversprechende Wirksamkeit [Bowman, 98a]. Ganz in Analogie zu unseren Daten [Bowman, 98b] stand auch bei den Patienten die Aktivierung von NK-Zellen im Vordergrund [1,2,15]. Deshalb wurde die Frage untersucht, ob IL-12 einen Vorteil gegenüber IL-2 besitzt, um eine T-Zell Aktivierung zu induzieren, da IL-12 als stärkeres T<sub>H</sub>1 Zytokin beschrieben wurde [Trinchieri, 94].

Zu diesem Zweck wurde zunächst eine lineare "single chain" Version des heterodimeren IL-12 hergestellt und in der Neuroblastomgentherapie eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen jetzt eindeutig eine T-Zell vermittelte anti-tumor Immunantwort [13]. Da die Ausbildung des immunologischen Gedächtnis im Anschluß an IL-12 Gentherapie nicht optimal war, wurde die Frage untersucht, ob sich dies durch kleine Dosen IL-2 Immunzytokin verbessern ließe. Die Daten zeigen eine ausgeprägte Amplifizierung der Gedächtnisimmunantwort nach IL-12 Gentherapie mit tumorspezifischem IL-2 Immunzytokin [14], ein Prinzip, daß sich für eine Vielzahl anderer Impfstrategien bestätigte, einschließlich der DNA-Impfstoffe [20].

Die Untersuchung des Mechanismus der IL-12 Gentherapie beim Neuroblastom ergab einen neuen Aspekt: Die Aktivierung der T-Zellen hängt wesentlich von der Bildung des Chemokins IP-10 ab, das in der Zytokin Kaskade "downstream" von IL-12 und IFN- $\gamma$  freigesetzt wird [16]. Dieses Ergebnis wurde durch in vivo Depletion von IP-10 mit monoklonalem anti-IP-10 Antikörper möglich. In anti-IP-10 behandelten Mäusen war IL-12 Gentherapie nicht wirksam. Zusammenfassend konnte in den Arbeiten 13-16 gezeigt werden, daß IL-12 im Gegensatz zu IL-2 in der Lage ist, bei dem schwach immunogenen Neuroblastom eine T-Zell-Immunantwort auszulösen und daß dieser Effekt wesentlich über das Chemokin IP-10 vermittelt ist.

## 4 DNA-Vakzine

Ein neuer Ansatz zur aktiven Immuntherapie maligner Erkrankungen ist der Einsatz von DNA-Impfstoffen. Das Prinzip beruht darauf, ein tumor-assoziiertes Antigen in einer Plasmid-DNA zu kodieren, das nach in vivo Applikation zur Protein-Expression führt [Raz, 97; Tighe, 98]. Hier macht man sich die Vielseitigkeit des Vektordesigns zu Nutze, um die Immunogenität des Antigens sowie seine intrazelluläre Verstoffwechselung zu optimieren. Kritisch für die Wirksamkeit ist einen ausreichenden Gentransfer in vivo zu erzielen. Hier haben sich Bakterien als Vehikelsysteme bewährt, wie zum Beispiel attenuierte *Salmonella typhimurium* Stämme [Darji, 97], die auch in unseren Arbeiten zum Einsatz kamen [17-22] (Abbildung 7).

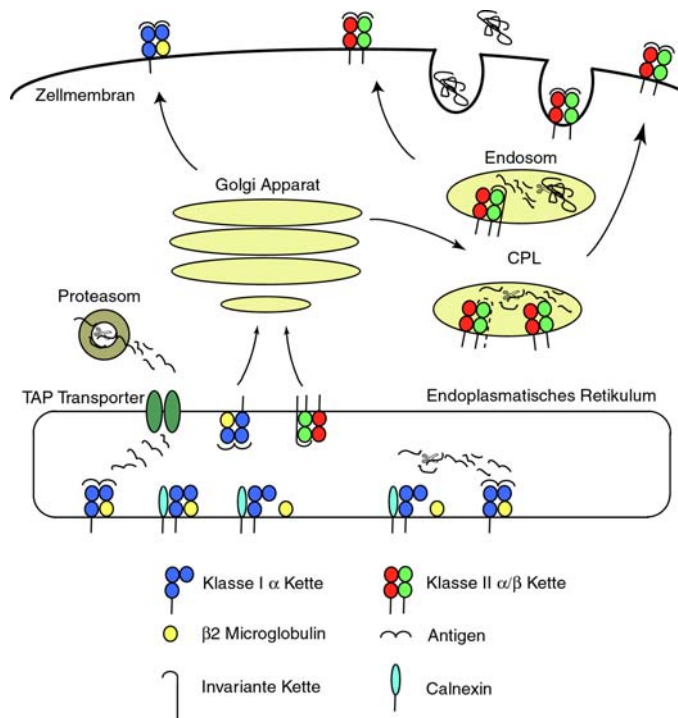


**Abbildung 7: Prinzip der oralen Immunisierung mit DNA-Impfstoffen**

Originalarbeiten 17-22

Plasmid-DNA, die für den Impfstoff kodiert, wird durch Elektroporation in attenuierte *Salmonella typhimurium* SL 7207 transfiziert. Diese Salmonellen penetrieren entsprechend ihres natürlichen Infektionsweges die Darmmukosa durch die M-Zellen und werden in den Peyerschen Plaques von Makrophagen und dendritischen Zellen (APCs) phagozytiert. Dort sterben die Salmonellen aufgrund ihrer Attenuierung und setzen den DNA-Impfstoff frei. Dieser wird in den APCs in Protein umgeschrieben. Durch die Proteasom-abhängigen Degradation des Proteins werden Peptidantigene hergestellt, die im endoplasmatischen Retikulum mit Major Histokompatibilitäts Klasse I (MHC I) Antigenen zusammengesetzt werden. Die MHC I/Peptid Komplexe werden an der Oberfläche T-Zellen präsentiert was die Voraussetzung für das 1. Signal der T-Zell Rezeptoraktivierung liefert.

Neben einem effizienten System zur in vivo Applikation von DNA Impfstoffen ist ferner das verwendete Vektorsystem ein Schlüsselement. In unseren Arbeiten wurden eine Reihe unterschiedlicher Vektoren verwendet, die alle auf pCMV 3FUb basieren [Rodriguez, 97]. Die Besonderheit dieses Vektors ist die Expression von Antigenen als Fusionsprotein mit Ubiquitin. Ubiquitin ist ein wichtiges Signalelement zur Degradation von Proteinen im Proteasom, das wesentlich an der Herstellung von T-Zellantigenen beteiligt ist [Groettrup, 96](Abbildung 8).



**Abbildung 8: Ubiquitin-abhängige Degradation von Proteinen zur Herstellung von T-Zell Antigenen**

Originalarbeiten 17-22

Ubiquitin ist ein hochkonserviertes Protein aus 76 Aminosäuren, das Proteine nach enzymatischer Polyubiquitinierung für selektive Proteasom-abhängige Degradation markiert. Diese erfolgt nach Abspaltung der Polyubiquitinkette im 26S Proteasom, das strukturell und funktional dem 20S Proteasom sehr ähnlich ist. Peptide werden nach Entstehung im 20S oder 26S Proteasom über TAP (transporter associated with antigen processing) Transporter durch die Membran des ER transportiert. Es handelt sich dabei um einen heterodimeren Transporter, der aus 2 Untereinheiten, TAP-1 und TAP-2, aufgebaut ist und aus der Familie der ABC (ATP Binding Cassette)-Transporter stammt, ähnlich der MDR (multi drug resistance)-1 Pumpe. Es konnte gezeigt werden, daß TAP-Moleküle direkt an der Zusammensetzung des trimolekularen Komplexes aus MHC Klasse I α Kette, β2 Mikroglobulin und Peptidantigen beteiligt sind, indem die Peptide direkt auf neu synthetisierte Klasse I Moleküle transferiert werden. Weitere am intrazellulären Peptidtransport beteiligte Moleküle sind Hitzeschockproteine HSPs (heat shock protein). HSP gp96 kann den Transport in das ER ähnlich dem TAP Transporter bewerkstelligen, während HSP70 und HSP90 im Zytosol den Peptid-Verkehr zu den TAP Transportern gewährleisten. Ferner wurde in bestimmten Systemen beschrieben, daß auch durch proteolytische Aktivität im ER selbst MHC Klasse I Peptide bereitgestellt werden können. Nach dem Erscheinen der Peptide im ER findet deren Einbau in den trimolekularen Komplex aus MHC Klasse I α Kette und β2 Mikroglobulin statt. Beide MHC Klasse I Untereinheiten werden im ER synthetisiert. MHC Klasse I α Ketten können das endoplasmatische Retikulum nicht verlassen, bevor sie nicht mit β2 Mikroglobulin und dem Peptid zusammengesetzt wurden. Hier spielt das Calnexin eine wichtige Rolle, welches der "Qualitätskontrolle" dient und verhindert daß fehlerhaft oder ungefaltete Moleküle das endoplasmatische Retikulum verlassen. Ferner ist der Komplex aus α Kette und β2 Mikroglobulin ohne Peptid thermodynamisch instabil und erst der trimolekulare Komplex einschließlich dem Peptidantigen erhöht die thermodynamische Stabilität und schützt vor Proteolyse. Calnexin wird dann

überflüssig und abgespalten. Nach erfolgreichem Zusammenbau wird der Komplex über den Golgi Apparat an die Zelloberfläche transportiert.

Wirksamkeit und Mechanismus der Vakzinierung mit attenuierten *Salmonella typhimurium* SL 7207 sowie effizienter Gentransfer wurde mit etablierten Peptidantigenen für das Melanom in einem Syngenem Mausmodell bewiesen [18]. Eine wesentliche Voraussetzung zur Herstellung eines DNA Impfstoffs für das Neuroblastom ist die Identifikation eines geeigneten Antigens. Durch eine Analogie zum Melanom gelang es, beim Neuroblastom mit der Tyrosinhydroxylase ein interessantes Antigen herauszuarbeiten [17, 21, 22]. Beim Melanom ist Tyrosinase, das Schrittmacherenzym der Melaninbiosynthese, ein gut etabliertes T-Zell-Antigen. Beim Neuroblastom gibt es einen ähnlichen tumorassoziierten Biosyntheseweg, der zur Bildung von Katecholaminen führt. Das Schrittmacherenzym hier ist die Tyrosinhydroxylase. Es wurde deshalb die Frage untersucht, ob mit der oben beschriebenen Vakzinierungsstrategie aus attenuierten Salmonellen SL 7207 und pCMV 3FUb Vektor, der für das gesamte Gen der Tyrosinhydroxylase kodiert, eine protektive Immunität gegen das Neuroblastom induziert wird. Zu diesem Zweck wurden Mäuse oral mit Tyrosinhydroxylase immunisiert und 2 Wochen nach der letzten Impfung mit Neuroblastomzellen inokuliert.

Die geimpften Mäuse zeigten sowohl ein reduziertes subkutanen Tumorwachstum [17], als auch eine verminderte spontane Metastasierungsrate [21,22] im Gegensatz zu Kontrollgruppen, die den leeren Vektor erhielten. Basierend auf diesen Daten wurden drei Optimierungsstrategien untersucht, um den Impfstoff weiter zu verbessern. Erstens wurde eine die WPRE Sequenz aus dem Walddarmmeltier- ("Woodchuck") Hepatitis Virus verwendet, welche in der Lage ist mRNA posttranskriptionell zu stabilisieren. Mit dieser Sequenz konnte die Wirksamkeit deutlich gesteigert werden [21]. Zweitens konnte durch die gerichtete Gabe von IL-2 mittels tumorspezifischem Immunzytokin die Impfwirkung oraler DNA-Impfstoffe deutlich gesteigert werden [20,21]. Die Grundlage für diese Kombinationsstrategie wurde bereits durch Gentherapie mit scIL-12 und Boosterung mit IL-2 Immunzytokin gelegt [14]. In Analogie zu dieser Arbeit wurde IL-2 Immunzytokin zur Boosterung von zwei oralen DNA-Impfstoffen für das Melanom [20] und das Neuroblastom [21] eingesetzt. Drittens wurde durch die Verwendung eines bifunktionalen Vektors, der zum einen für das Antigen kodiert und zum anderen für CD40 Ligand Trimer, eine weitere Steigerung der Impfwirkung erreicht [19]. CD40 Ligand Trimer stimuliert über CD40 antigenpräsentierende Zellen (APCs), optimiert so die Präsentation von Antigenen und verbessert die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie B7.1 und B7.2, die das 2. Signal zur T-Zell Rezeptoraktivierung liefern. Wirksamkeit und Mechanismus dieser Strategie wurden auch in einem Kolonkarzinommodell gezeigt und werden derzeit in das Neuroblastommodell übernommen. Zusammenfassend zeigt sich wie in den vorherigen Kapiteln, daß sich ein wirksamer anti-Tumor Effekt nur durch Kombinationsstrategien erreichen läßt.



## Literaturverzeichnis

Batova, A.; Kamps, A.; Gillies, S. D.; Reisfeld, R. A. und Yu, A. L. (1999): The Ch14.18-GM-CSF fusion protein is effective at mediating antibody-dependent cellular cytotoxicity and complement-dependent cytotoxicity in vitro, *Clin Cancer Res* (Band 5), Nr. 12, Seite 4259-4263.

Becker, J. C.; Pancook, J. D.; Gillies, S. D.; Furukawa, K. und Reisfeld, R. A. (1996a): T cell-mediated eradication of murine metastatic melanoma induced by targeted interleukin 2 therapy, *J.Exp.Med.* (Band 183), Nr. 5, Seite 2361-2366.

Becker, J. C.; Varki, N. M.; Gillies, S. D.; Furukawa, K. und Reisfeld, R. A. (1996b): An antibody-interleukin 2 fusion protein overcomes tumor heterogeneity by induction of a cellular immune response, *Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.* (Band 93), Seite 7826-7831.

Bowman, L.; Grossmann, M.; Rill, D.; Brown, M.; Zhong, W. Y.; Alexander, B.; Leimig, T.; Coustan-Smith, E.; Campana, D.; Jenkins, J.; Woods, D.; Kitchingman, G.; Vanin, E. und Brenner, M. (1998a): IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma, *Blood* (Band 92), Nr. 6, Seite 1941-1949.

Bowman, L. C.; Grossmann, M.; Rill, D.; Brown, M.; Zhong, W. Y.; Alexander, B.; Leimig, T.; Coustan-Smith, E.; Campana, D.; Jenkins, J.; Woods, D. und Brenner, M. (1998b): Interleukin-2 gene-modified allogeneic tumor cells for treatment of relapsed neuroblastoma, *Hum Gene Ther* (Band 9), Nr. 9, Seite 1303-1311.

Brooks, P. C.; Clark, R. A. und Cheresch, D. A. (1994a): Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis, *Science* (Band 264), Nr. 5158, Seite 569-571.

Brooks, P. C.; Montgomery, A. M.; Rosenfeld, M.; Reisfeld, R. A.; Hu, T.; Klier, G. und Cheresch, D. A. (1994b): Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels, *Cell* (Band 79), Nr. 7, Seite 1157-1164 .

Darji, A.; Guzman, C. A.; Gerstel, B.; Wachholz, P.; Timmis, K. N.; Wehland, J.; Chakraborty, T. und Weiss, S. (1997): Oral somatic transgene vaccination using attenuated *S. typhimurium*, *Cell* (Band 91), Nr. 6, Seite 765-775.

Frost, J. D; Hank, J. A.; Reaman, G. H.; Frierdich, S. R. N.; Seeger, R. C.; Gan, J.; Anderson, P. M.; Ettinger, L. J.; Cairo, M. S.; Blazar, B. R.; Krailo, M. D.; Matthay, K. K.; Reisfeld, R. A. und Sondel, P. M. (1997): Phase I/IB trial of murine monoclonal anti-GD2 antibody 14.G2a plus Il-2 in children with refractory neuroblastoma: a report of the children's cancer group, *Cancer* (Band 80), Seite 317-333.

Gillies, S. D.; Young, D.; Lo, K. M.; Foley, S. F. und Reisfeld, R. A. (1991): Expression of genetically engineered immunoconjugates of lymphotoxin and a chimeric anti-ganglioside GD2 antibody, *Hybridoma* (Band 10), Nr. 3, Seite 347-356.

Gillies, S. D.; Young, D.; Lo, K. M. und Roberts, S. (1993): Biological activity and in vivo clearance of antitumor antibody/cytokine fusion proteins, *Bioconjugate Chemistry* (Band 4), Nr. 3, Seite 230-235.



Gillies, S.D.; Lan, Y.; Wesolowski, J. D.; Qian, X.; Reisfeld, R. A.; Holden, S. und Lo, K. M. (1998): Antibody-IL-12 fusion proteins are effective in SCID mouse models of prostate and colon carcinoma metastases, *J.Immunol.* (Band 160), Seite 6195-6203.

Groettrup, M.; Soza, A.; Kuckelkorn, U. und Kloetzel, P. M. (1996): Peptide antigen production by the proteasome: complexity provides efficiency, *Immunol Today* (Band 17), Nr. 9, Seite 429-435.

Handgretinger, R.; Anderson, K.; Lang, P.; Dopfer, R.; Klingebiel, T.; Schrappe, M.; Reuland, P.; Gillies, S. D. ; Reisfeld, R. A. und Neithammer, D. (1995): A phase I study of human/mouse chimeric antiganglioside GD2 antibody ch14.18 in patients with neuroblastoma, *Eur.J.Cancer* (Band 31A), Nr. 2, Seite 261-267.

Handgretinger, R.; Baader, P.; Dopfer, R.; Klingebiel, T.; Reuland, P.; Treuner, J.; Reisfeld, R. A. und Neithammer, D. (1992): A phase I study of neuroblastoma with the anti-ganglioside GD2 antibody 14.G2a, *Cancer Immunology, Immunotherapy* (Band 35), Nr. 3, Seite 199-204.

Kohler, G. und Milstein, C. (1975): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity, *Nature* (Band 256), Nr. 5517, Seite 495-497.

Matthay, K. K.; Villablanca, J. G.; Seeger, R. C.; Stram, D. O.; Harris, R. E.; Ramsay, N. K.; Swift, P.; Shimada, H.; Black, C. T.; Brodeur, G. M.; Gerbing, R. B. und Reynolds, C. P. (1999): Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group, *N Engl J Med* (Band 341), Nr. 16, Seite 1165-1173.

Neithammer, D. und Handgretinger, R. (1995): Clinical strategies for the treatment of neuroblastoma, *Eur.J.Cancer* (Band 31A), Nr. 4, Seite 568-571.

Pancook, J. D.; Becker, J. C.; Gillies, S. D. und Reisfeld, R. A. (1996): Eradication of established hepatic human neuroblastoma metastases in mice with severe combined immunodeficiency by antibody-targeted interleukin-2, *Cancer Immunology, Immunotherapy* (Band 42), Nr. 2, Seite 88-92.

Pardoll, D. M. (1995): Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. [Review] [63 refs], *Annual Review of Immunology* (Band 13), Seite 399-415.

Pardoll, D. M. (1998): Cancer vaccines. [Review] [128 refs], *Nature Medicine* (Band 4), Nr. 5 Suppl, Seite 525-531.

Raz, E. (1997): Introduction: gene vaccination, current concepts and future directions. [Review] [46 refs], *Springer Seminars in Immunopathology* (Band 19), Nr. 2, Seite 131-137.

Reisfeld, R. A.; Gillies, S. D.; Mendelsohn, J.; Varki, N. M. und Becker, J. C. (1996): Involvement of B lymphocytes in the growth inhibition of human pulmonary melanoma metastases in athymic nu/nu mice by an antibody-lymphotoxin fusion protein, *Cancer Research* (Band 56), Nr. 8, Seite 1707-1712.

Riethmueller, G.; Schneider-Gaedicke, E.; Schlimok, G.; Schmiegell, W. ; Raab, R.; Hoffken, K.; Gruber, R.; Pichlmaier, H.; Hirche, H.; Pichelmayer, R.; Buggisch, P. und Witte, J. (1994): Randomised trial of monoclonal antibody for adjuvant therapy of resected Dukes'C

colorectal carcinoma (The German Cancer Aid 17-1A Study group), Lancet (Band 94), Seite 1177-1183.

Rodriguez, F.; Zhang, J. und Whitton, J. L. (1997): DNA immunization: ubiquitination of a viral protein enhances cytotoxic T-lymphocyte induction and antiviral protection but abrogates antibody induction, J Virol (Band 71), Nr. 11, Seite 8497-8503.

Sabzevari, H.; Gillies, S. D.; Mueller, B. M.; Pancook, J. D. und Reisfeld, R. A. (1994): A recombinant antibody-interleukin 2 fusion protein suppresses growth of hepatic human neuroblastoma metastases in severe combined immunodeficiency mice, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Band 91), Nr. 20, Seite 9626-9630.

Silverstein, A. M. (1988), Jovanovich, H. B., A history of immunology , Seite 1-383, Academic Press Inc. , San Diego.

Tighe, H.; Corr, M.; Roman, M. und Raz, E. (1998): Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint, Immunol Today (Band 19), Nr. 2, Seite 89-97.

Trinchieri, G. (1994): Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. [Review] [150 refs], Blood (Band 84), Nr. 12, Seite 4008-4027.

## Anhang

### Eigene Veröffentlichungen:

1. H.N. Lode, R. Xiang, N.M. Varki, C.S. Dolman, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld  
Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow.  
Journal of the National Cancer Institute, 89, 1586-1594, 1997.
2. H.N. Lode, R. Xiang, T. Dreier, N.M. Varki, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld  
Natural killer-cell mediated eradication of neuroblastoma metastases to bone marrow by targeted interleukin-2 therapy.  
Blood, 91, 1706-1715, 1998.
3. H.N. Lode, R. Xiang, U. Pertl, E. Förster, S.P. Schoenberger, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld  
Melanoma immunotherapy by targeted interleukin-2 depends on CD4+ T-cell help mediated by CD40/CD40L interaction.  
Journal of Clinical Investigation, 101, 1623-1630, 2000.
4. R. Xiang, H.N. Lode, C.S. Dolman, T. Dreier, N.M. Varki, X. Qian, K. Lo, Y. Lan, M. Super, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld  
Elimination of established murine colon carcinoma metastases by antibody-interleukin 2 fusion protein therapy.  
Cancer Research, 57, 4948-4955, 1997.
5. R. Xiang, H.N. Lode, T. Dreier, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld  
Induction of persistent tumor-protective immunity in mice cured of established colon carcinoma metastases.  
Cancer Research, 58, 3918-3925, 1998.
6. R. Xiang, H.N. Lode, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld  
T cell memory against colon carcinoma is long-lived in the absence of antigen.  
Journal of Immunology, 163, 3676-3683, 1999.
7. T. Dreier, H.N. Lode, R. Xiang, C.S. Dolman, R.A. Reisfeld, A.S. Kang  
Recombinant immunocytokines targeting the mouse transferrin receptor: construction and biological activities.  
Bioconjugate Chemistry, 9, 481-489, 1998.
8. H.N. Lode, T. Moehler, R. Xiang, S.D. Gillies, D.A. Cheresh, R.A. Reisfeld  
Synergy between an antiangiogenic integrin  $\alpha_v$  antagonist and an antibody-cytokine fusion protein eradicates spontaneous tumor metastases.  
Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 96, 1591-1596, 1999.
9. H.N. Lode, R.A. Reisfeld  
Immunocytokines for Cancer Immunotherapy.  
Biomedical Progress, 11, 33-37, 1998.
10. U. Pertl, R. Xiang, P. Kleindienst, J.C. Becker, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld, H.N. Lode  
Tumor targeting with immunocytokines: A novel approach for cancer therapy.

Minerva Biotechnologica, 10, 89-99, 1998.

11. H.N. Lode, R. Xiang, J.C. Becker, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld  
Immunocytokines: a promising approach to cancer immunotherapy.  
Pharmacology and Therapeutics, 80, 277-292, 1998.
12. H.N. Lode, R.A. Reisfeld  
Immunzytokine für die Krebsimmuntherapie.  
Die Gelben Hefte, 39, 43-50, 1999.
13. H.N. Lode, T. Dreier, R. Xiang, N.M. Varki, A.S. Kang, R.A. Reisfeld  
Gene therapy with a single chain interleukin-12 fusion protein induces T-cell-dependent protective immunity in a syngeneic model of murine neuroblastoma.  
Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 95, 2475-2480, 1998.
14. H.N. Lode, R. Xiang, S.R. Duncan, A.N. Theofilopoulos, S.D. Gillies, R.A. Reisfeld  
Tumor targeted interleukin-2 amplifies T-cell mediated immune response induced by gene therapy with single-chain IL-12.  
Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 96, 8591-8596, 1999.
15. D. Balicki, R.A. Reisfeld, U. Pertl, E. Beutler, H.N. Lode  
Histone H2A-mediated transient cytokine gene delivery induces efficient anti-tumor responses in murine neuroblastoma.  
Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 97, 11500-11504, 2000.
16. U. Pertl, A.D. Luster, N.M. Varki, G. Gaedicke, R.A. Reisfeld, H.N. Lode  
IFN- $\gamma$ -inducible protein-10 is essential for the generation of a protective tumor specific CD8 T cell response induced by single-chain IL-12 gene therapy.  
The Journal of Immunology, 166, 6944-6951, 2001.

## **Danksagung**

Die in dieser Schrift zusammengefaßte Arbeit erfolgte in mehreren Stufen und wurde in jeder Stufe von besonderen Menschen begleitet für deren Beiträge ich an dieser Stelle danken will. Für die ersten einführenden Schritte experimentell zu denken und den ersten Einblick in die Faszination experimenteller Medizin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. U.F. Schade, meinem Onkel, bedanken. Die wissenschaftliche Methodik und seine experimentelle Anwendung wurden durch weitere Lehrer wesentlich beeinflusst wie PD Dr. G. Bruchelt und Prof. Dr. D. Niethammer während der Promotionszeit an der Universität Tübingen. Die klinische Erfahrung der besonderen sozialen Problematik in der pädiatrischen Onkologie war ein enormer Antrieb hier nach therapeutischen Lösungen zu suchen. In der nächsten Stufe am Scripps Research Institute in La Jolla CA war es Prof. Ralph A. Reisfeld, der es verstand angelegte Knospen zur vollen Blüte zu bringen, und ich bedanke mich bei Ihm als Lehrer und als Freund für die sehr intensiven und produktiven Jahre. Der Aufbau einer eigenen Laborgruppe an der Humboldt Universität in Berlin sowie die Fortsetzung der pädiatrischen Ausbildung wurde durch Herrn Prof. G. Gaedicke katalysiert, dem ich an dieser Stelle für seine uneingeschränkte Unterstützung in allen Lebenslagen recht herzlich danken will. Über alle Stufen hinweg begleitete mich die Familie, Eltern, Großeltern, meine Frau, Diana Lode und später meine Kinder, Björn und Lena, denen ich für die zeitlichen Entbehrungen und die Unterstützung über die Jahre außerordentlich dankbar bin.

### **Stufen**

Wie jede Blüte welkt und jede Jugend  
Dem Alter weicht, blüht jede Lebensstufe,  
Blüht jede Weisheit auch und jede Tugend.  
Zu ihrer Zeit und darf nicht ewig dauern.  
Es muß das Herz bei jedem Lebensrufe  
Bereit zum Abschied sein und Neubeginne,  
Um sich in Tapferkeit und ohne Trauern  
In andre, neue Bindung zu geben.  
Und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne,  
Der uns beschützt und der uns hilft zu leben.  
Wir sollen heiter Raum und Raum durchschreiten,  
An keinem wie an einer Heimat hängen,  
Der Weltgeist will nicht fesseln uns und engen,  
Er will uns Stuf' um Stufe heben, weiten.  
Kaum sind wir heimisch einem Lebenskreise  
Und traulich eingewohnt, so droht Erschlaffen,  
Nur wer bereit zum Aufbruch ist und Reise,  
Mag lähmender Gewöhnung sich entrafen.  
Es will vielleicht auch noch die Todesstunde  
Uns neuen Räumen jung entgegen senden,  
Des Lebens Ruf an uns wird niemals enden...  
Wohlan denn, Herz, nimm Abschied und gesunde!

Hermann Hesse

Das Gedicht beschreibt den in dieser Schrift inhaltlich zusammengefaßten Lebensabschnitt, der somit auch nur eine weitere Stufe ist.

## Eidesstattliche Erklärung

### EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....  
Datum

.....  
Unterschrift